

DESENVOLVIMENTO DE MODELO ANIMAL *IN VIVO* PARA VERTEBROPLASTIA PERCUTÂNEA

**Maria Teresa Oliveira¹, José Caeiro Potes², Maria Cristina Queiroga³, Sarrawat Rehman⁴,
Kenneth Dalgarno⁵, António Ramos⁶ e Joana da Costa Reis⁷**

1 Departamento de Medicina Veterinária, ECT, ICAAM, Universidade de Évora, Portugal; toliveir@uevora.pt

2 Departamento de Medicina Veterinária, ECT, ICAAM, Universidade de Évora; jacpotes@uevora.pt

3 Departamento de Medicina Veterinária, ECT, ICAAM, Universidade de Évora, Portugal; crique@uevora.pt

4 JRI Orthopaedics, Sheffield, United Kingdom; rehman.sarrawat@jri-ltd.co.uk

*5 School of Mechanical and Systems Engineering, Newcastle University, United Kingdom;
kenny.dalgarno@newcastle.ac.uk*

6 Biomechanics Research Group, TEMA, Universidade de Aveiro, Portugal; a.amos@ua.pt

7 Departamento de Medicina Veterinária, ECT, Universidade de Évora, Portugal; CICECO, Universidade de Aveiro, Portugal; jmfcr@uevora.pt

PALAVRAS CHAVE: vertebroplastia percutânea; acesso parapedicular; ovino; *ex vivo*; *in vivo*.

RESUMO: A vertebroplastia percutânea (VP) é um procedimento minimamente invasivo realizado frequentemente em medicina humana para tratamento de fracturas vertebrais, através da injeção de um cimento ósseo. O teste de novos biomateriais depende de modelos animais adequados. O objectivo deste estudo foi desenvolver um modelo de vertebroplastia em ovinos que fosse reprodutível e seguro. No estudo *ex vivo* a vertebroplastia foi realizada através de um acesso parapedicular bilateral modificado em 24 vértebras lombares de ovino, divididas em 4 grupos. O cimento utilizado num grupo de controlo foi o Cerament™ (Bone Support, Lund, Sweden). No grupo experimental foi testado um novo compósito – Spine-Ghost – que consiste numa matriz de sulfato de cálcio enriquecida com partículas micrométricas de um vidro bioactivo mesoporoso. Todas as vértebras foram analisadas por micro-TAC e submetidas a testes mecânicos de compressão. Para o estudo *in vivo*, 16 ovelhas foram aleatoriamente divididas em dois grupos – controlo e experimental – e submetidas a VP, utilizando os mesmos cimentos do *ex vivo*. Todas as vértebras foram analisadas post-mortem por micro-TAC e histologia.

1 INTRODUÇÃO

A vertebroplastia percutânea (VP) é uma cirurgia minimamente invasiva usada frequentemente, em medicina humana, no tratamento de fracturas vertebrais, através da injeção de um cimento ósseo.

Até à data, só um número reduzido de estudos de VP em ovinos foi realizado, apresentando sempre limitações [1, 2].

O objectivo deste estudo foi desenvolver *ex vivo* um modelo seguro e reprodutível de VP em ovinos e transpô-lo para *in vivo*. Assim, considerando as diferenças anatómicas entre

ovinos e humanos [1], desenvolveu-se uma abordagem parapedicular bilateral modificada, possibilitando a criação de um defeito ósseo que permite testar novos biomateriais sem comprometer a função neurológica ou biomecânica [3].

2 EXPERIMENTAL

Este estudo foi realizado *ex vivo* e *in vivo* utilizando como modelo animal o ovino, de raça Merina Preta.

2.1 ESTUDO *EX VIVO*

Foram realizadas VP's *ex vivo*, através de uma abordagem parapédicular bilateral modificada, em 24 hemivértebras lombares craniais (L4-L6), divididas em quatro grupos (n=6): A) vértebras intactas; B) vértebras com defeito não tratadas; C) vértebras com defeito injectadas com Cerament™; D) vértebras com defeito injectadas com Spine-Ghost. Para o efeito, as vértebras foram posicionadas sobre uma mesa radiolúcida, sobre a face ventral, e um sistema de introdução óssea foi utilizado (Kyphon, Express®, Osteo Introducer® System, tamanho 3, Medtronic Spine LLC, Portugal). O acesso foi realizado entre os pedículos e as apófises transversas. Logo, colocou-se uma cavilha óssea de 3,5 mm de diâmetro no interior de uma cânula com 4 mm de diâmetro, de modo a aceder manualmente ao córtex dorsolateral dos corpos vertebrais. Após perfurar-se o osso cortical, substituiu-se a cavilha por uma broca manual de precisão com 3,35 mm de diâmetro, que avançou através da cânula, de modo a perfurar o osso trabecular com uma orientação 30-50°, relativamente a um plano transversal, e 0-30°, relativamente a um plano frontal. Os resíduos ósseos resultantes foram removidos. Todas as vértebras foram analisadas por micro-TAC enquanto intactas e após a criação dos defeitos e injeção dos cimentos. Os seguintes parâmetros foram avaliados no *software* do aparelho (CTAn, Skyscan, Kontich, Bélgica): altura vertebral (AV), densidade mineral óssea trabecular (DMOt) e volume de interesse do defeito (VID). Todas as vértebras foram sujeitas a testes mecânicos de compressão axial para avaliação da rigidez óssea e da resistência à fractura. Para tal, as mesmas foram montadas entre duas placas paralelas de polimetilmetacrilato (PMMA, Vertex Cold Cure).

Os dados obtidos foram analisados usando o SPSS 22 (IBM SPSS Statistics V22, Nova Iorque, EUA). Foi efectuada a análise One Way ANOVA; a normalidade verificada

usando o teste de Kolmogorov-Smirnov; a homogeneidade de variância verificada com o teste de Brown-Forsythe; as médias foram comparadas usando o teste de Tukey.

2.2 ESTUDO *IN VIVO*

O manejo animal e as cirurgias foram conduzidos de acordo com a Directiva 2010/63/EU para utilização de animais de laboratório e após a obtenção das licenças legais necessárias junto das autoridades nacionais competentes.

Para o estudo *in vivo*, 16 ovelhas foram distribuídas aleatoriamente por dois grupos (n=8): E) grupo controlo, injectado com Cerament™; F) grupo experimental, injectado com Spine-Ghost, um novo biomaterial composto por uma matriz de sulfato de cálcio, enriquecida por micropartículas de vidro mesoporoso e bioactivo [4].

A anestesia foi realizada segundo o protocolo: pré-medicação com atropina subcutânea (0,05 mg/kg), xilazina intramuscular (0,1 mg/kg), butorfanol endovenoso (0,01 mg/kg) e carprofeno subcutâneo (2 mg/kg). A indução foi com tiopental sódico 5% endovenoso (5-10 mg/kg) e a manutenção da anestesia foi assegurada com isofluorano a 1-2%, com ventilação espontânea.

Após a pré-medicação, os animais foram posicionados numa mesa radiolúcida, em decúbito ventral, com os membros posteriores traccionados caudalmente e fixados à mesa. O campo cirúrgico, tricotomizado, foi desinfectado com iodopovidona e álcool a 70°, e o monitor de anestesia conectado ao animal.

Os defeitos foram criados com base no modelo *ex vivo* no corpo vertebral de L4 [3]. Sob controlo táctil e fluoroscópico (Digital C-Arm ZEN 2090 Pro, Genoray, Co., Ltd., Korea), introduziu-se uma cavilha óssea de 2,5 mm (Kyphon, Express®, Osteo Introducer® System, tamanho 2, Medtronic Spine LLC, Portugal) dentro de uma cânula de 3 mm de diâmetro, num ponto 2-3 cm

lateralmente à linha média da apófise espinhosa, com uma orientação de 45° relativamente ao plano transverso. Atravessando a pele e a camada muscular subjacente, seguiu-se em direcção ao espaço situado entre o pedículo e a face cranial da apófise transversa. Após perfurar manualmente o osso cortical do corpo vertebral, a cavilha foi substituída por uma broca manual de precisão de 2,5 mm que avançava 1-2 cm, até atingir a linha média da hemivértebra cranial (seguindo uma orientação de 30-50° segundo o plano transverso e 0-30° segundo o plano frontal). O mesmo procedimento foi realizado contralateralmente, criando um defeito em forma de “V”, tendo-se o cuidado de ligar os defeitos (Fig. 1).



Fig. 1. Posicionamento dos instrumentos cirúrgicos, após a ligação dos dois defeitos.

O Cerament™ e o Spine-Ghost foram preparados à temperatura ambiente, de acordo com as instruções dos fabricantes. A broca foi substituída por uma cânula de injeção (Kyphon® Express™ Bone Biopsy Device, tamanho 2, Medtronic Spine LLC, Portugal) e os cimentos esterilizados foram injectados nos defeitos, sob controlo fluoroscópico. A média dos tempos de injeção foi aproximadamente 1 minuto e a média dos volumes injectados foi de 1,2 mililitros.

Todas as ovelhas permaneceram anestesiadas durante 2 horas após a injeção, para permitir a cura dos cimentos, sendo que todas se levantaram e começaram a comer,

terminado esse período. Durante o período pós-operatório (7 dias), os animais foram tratados com amoxicilina e ácido clavulânico subcutâneos (15 mg/kg, uma vez por dia), carprofeno subcutâneo (2 mg/kg, uma vez por dia) e butorfanol intramuscular (0,15 mg/kg, de doze em doze horas). 15 dias após as cirurgias, as ovelhas foram injectadas com um fluorocromo (calceína verde, 15 mg/kg, subcutâneo) e libertadas para a pastagem, local onde permaneceram durante o período de implantação (6 meses). Quinze dias antes da eutanásia, foi administrado outro fluorocromo (alizarina complexona, 25 mg/kg, subcutâneo). Os animais foram sacrificados através da administração endovenosa de pentobarbital sódico concentrado.

Todas as vértebras foram analisadas *post-mortem* por micro-TAC e histologia.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ESTUDO *EX VIVO*

Uma limitação conhecida do modelo vertebral ovino são as diferenças anatómicas entre as vértebras da ovelha e as vértebras humanas. A abordagem transpedicular, mais convencional na medicina humana, está associada ao risco de fractura do pedículo e ruptura do fóramen vertebral. Ademais, o ângulo de acesso limitado, resulta em defeitos mais pequenos. Para ultrapassar estas limitações e para evitar o fóramen nutricional, desenvolvemos um modelo com abordagem parapedicular às hemivértebras craniais [3].

As principais limitações cirúrgicas são: a elevada densidade óssea trabecular; a rigidez do osso cortical das vértebras lombares ovinas; o fóramen nutricional amplo. A vértebra L6, sendo mais curta, encontra-se mais predisposta à ruptura do fóramen vertebral, utilizando a técnica descrita.

O defeito resultante encontra-se ilustrado na Fig. 2. No estudo *ex vivo* observou-se

derrame de cimento para o fóramen vertebral em 2 de seis vértebras.

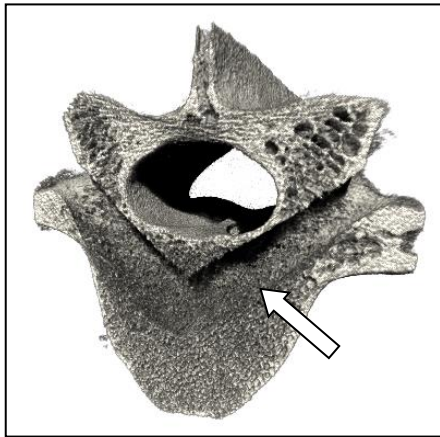


Fig. 2. L4 parcialmente reconstruída em 3D apresentando o defeito ósseo criado (seta branca).

No modelo *ex vivo*, a média da AV (n=24) foi $37,10 \pm 1,80$ mm, a média da DMOt (n=24) foi $0,3512 \pm 0,0493$ gcm⁻³ e a média do VID (n=18) foi $1275,46 \pm 219,29$ mm³ (Fig. 3).

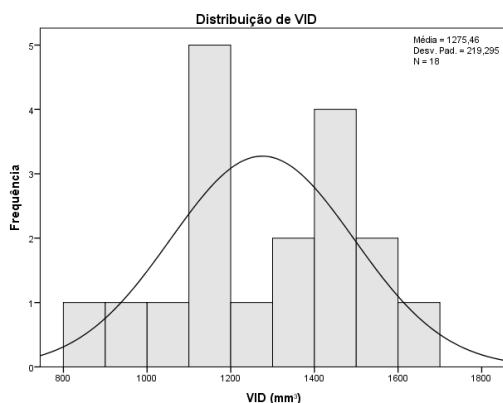


Fig. 3. Distribuição de VID, mostrados num histograma com curva normal (gráfico SPSS 22).

O micro-TAC revelou-se decisivo, permitindo identificar as características singulares das vértebras dos ovinos e os marcos anatómicos utilizados na cirurgia, minimizando a ocorrência de ruptura dos canais vertebral e nutricional durante a criação dos defeitos. Ademais, permitiu a avaliação das vértebras sem a sua destruição, visualizando-se a ruptura do canal vertebral em 25% dos casos.

Ambos os cimentos apresentaram fácil manuseamento e boa injectabilidade. O tempo de cura do Cerament™ foi de 8-10 minutos. Este cimento apresenta elevada radiopacidade, quando comparado com o osso, conferida pelo iohexol, o que facilitou a sua visualização durante a injeção, mas gerou artefactos no micro-TAC que impediram a correcta avaliação da injeção, como a medição do volume de cimento e a verificação de possíveis derrames (Fig. 4).

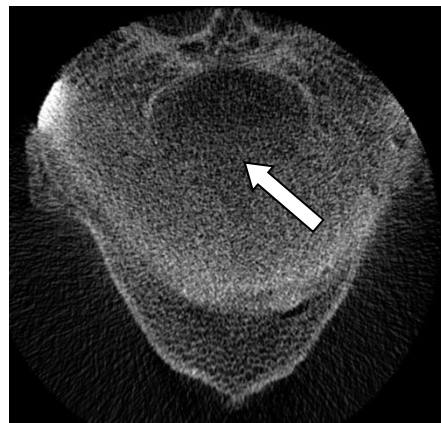


Fig. 4. Imagem de micro-TAC de uma L4 onde se visualiza o artefacto causado pelo Cerament™ (seta branca).

O tempo de cura do Spine-Ghost foi ligeiramente inferior ao do Cerament™ e a sua radiopacidade é moderada, sendo conferida pela sua fase vitrocerâmica bioactiva [4]. Por conseguinte, a sua visualização durante a injeção foi mais difícil, mas as imagens de micro-TAC apresentaram menos artefactos.

O teste de compressão mecânica permitiu verificar que todas as vértebras suportavam cargas muito superiores às cargas esperadas em condições fisiológicas (~1,3 kN) [3]. Foram calculadas a rigidez vertebral e a rigidez vertebral normalizada (valor corrigido dividindo a rigidez vertebral pelo valor da DMOt de cada vértebra). Não se encontraram diferenças estatísticas significativas entre os diferentes grupos. Assim sendo, o modelo desenvolvido é considerado reproduzível e seguro sob cargas superiores às fisiológicas.

3.2 ESTUDO *IN VIVO*

O estudo *in vivo* foi desenvolvido na vértebra L4, cujo corpo vertebral apresenta altura superior ao de L6, o que permitiu a criação de defeitos maiores. No estudo *in vivo* observou-se:

- derrame de cimento para o córtex ventral do corpo vertebral na segunda ovelha intervencionada;
- contacto pouco amplo entre os dois defeitos, em dois animais, do grupo E, obrigando a que a injeção de cimento fosse feita bilateralmente, de modo a evitar derrames.
- paragem cardio-respiratória em dois animais intervencionados também do grupo E, provavelmente devido a embolia pulmonar gorda [5]:
- défices neurológicos ligeiros e transitórios nos membros posteriores de um animal, também do grupo E, provavelmente por derrame de cimento na área dos pontos de entrada dos defeitos, que terá afectado as raízes dos nervos espinais; este animal manteve-se ambulatório e, ao fim de 2 meses, encontrava-se recuperado.

Todos os animais ficaram anestesiados durante duas horas, de acordo com as instruções do fabricante do Cerament™, após o que rapidamente se levantavam e procuravam alimento (Fig. 5)



Fig. 5. Ovelhas numa *boxe* do Hospital Veterinário, após recuperarem da anestesia.

As VP's foram um sucesso, com todos os animais a completarem o período de implantação de 6 meses (Fig. 6).



Fig. 6. Ovelhas na pastagem, após as cirurgias, durante o período de implantação de 6 meses.

A análise por micro-TAC revelou pequenas rupturas no (1) canal vertebral (26,7% das vértebras) (Fig. 7), (2) córtex vertebral (13,3%) (Fig. 8) e (3) canal nutricional (20%).

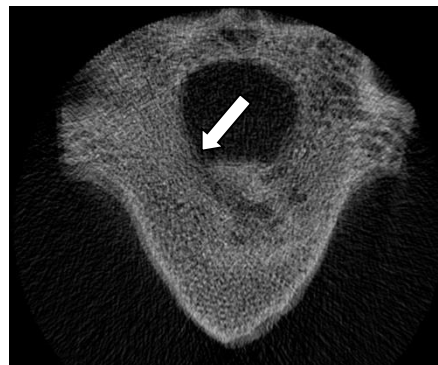


Fig. 7. Imagem de micro-TAC de L4 injectada com Cerament™, no estudo *in vivo*, com ruptura potencial do córtex do canal vertebral (seta branca).

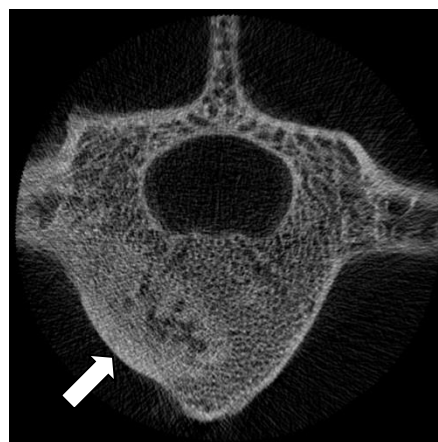


Fig. 8. Imagem de micro-TAC de L4 injectada com Cerament™, no estudo *in vivo*, com sinais de remodelação óssea no córtex do corpo vertebral, secundária a possível ruptura (seta branca).

Não obstante, não se verificou derrame de cimento para o canal vertebral em nenhuma vértebra, o que vai de encontro ao número baixo de animais com complicações neurológicas pós-cirúrgicas (1 em 16) e à taxa de sobrevivência registada (100%).

Os artefactos verificados no estudo *ex vivo* devido ao iohexol encontravam-se minimizados no estudo *in vivo*, uma vez que o cimento foi reabsorvido e houve neoformação óssea, como se pode observar nas figuras anteriores (Fig. 7 e 8).

4 CONCLUSÕES

O modelo de vertebroplastia percutânea apresentado é considerado adequado para estudos pré-clínicos. Todas as ovelhas recuperaram e completaram o período de implantação de 6 meses, sem registo de complicações associadas *major*, e não se verificou derrame de cimento para o canal vertebral no exame *post-mortem* de qualquer animal.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi suportado pela Comissão Europeia, ao abrigo do Sétimo Programa-Quadro, através do projecto Restoration, "Resorbable ceramic biocomposites for orthopaedic and maxillofacial applications", ao abrigo da acção "Collaborative project targeted to SMEs", grant agreement NMP.2011.2.1-1.

Este trabalho foi financiado por Fundos Nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia no âmbito do Projecto UID/AGR/00115/2013.

Agradece-se à Medtronic Spine LLC Company, Portugal pelo fornecimento do material cirúrgico e à Hamamatsu Photonics pelo fornecimento do Nanozoomer SQ®.

REFERÊNCIAS

- [1] L.M. Benneker, A. Giese, J. Krebs, A. Boger, P. F. Heini, V. Boner, "Development of an in vivo experimental model for percutaneous vertebroplasty in sheep", Vet. Comp. Orthop. Traumatol.: Vol. 25, 173–177, 2012.
- [2] Zhu XS, Zhang ZM, Mao HQ, Geng DC, Zou J, Wang GL, et al. A novel sheep vertebral bone defect model for injectable bioactive vertebral augmentation materials. J Mater Sci Mater Med 2011;22:159–64.
- [3] Oliveira MT, Lucena S, Potes J, Queiroga MC, Rehman S, Dalgarno K, et al. *Ex vivo* model for percutaneous vertebroplasty. Key Eng Mater 2015;631:408–13.
- [4] Vitale-Brovarone C, Pontiroli L, Novajra G, Tcacencu I, Reis J, Manca A. Spine-ghost: a new bioactive cement for vertebroplasty. Key Eng Mater 2015;631:43–7.
- [5] Aebli N, Krebs J, Davis G, Walton M, Williams MJA, Theis JC. Fat embolism and acute hypotension during vertebroplasty: an experimental study in sheep. Spine 2002;27:460–6.